

# 不同环境温度对虚寒证和虚热证线粒体复合体 II 活性的影响

闫盼盼 杨丽萍 黄睿 胡研萍 侯俊林 李新民 詹向红

**摘要 目的** 观察不同环境温度条件下虚寒证和虚热证线粒体复合体 II 活性的变化规律。**方法** 选择 2012 年 11 月在校的河南中医学院 1~3 年级本科生作为研究对象。通过中医体质量表和专家诊断筛选出虚寒证组(20 例)、虚热证组(20 例)及平和体质人群为健康对照组(20 名)。采用分光光度法检测各组不同环境温度下线粒体复合体 II 活性值。**结果** (1) 各组不同温度下复合体 II 活性比较:与本组室温条件下比较,健康对照组低温下复合体 II 活性值升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),虚寒证组、虚热证组差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );与健康对照组比较,虚寒证组低温、室温下复合体 II 活性值均降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与虚寒证组比较,虚热证组在室温、低温下复合体 II 活性值均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。(2) 复合体 II 活性调节速率变化:与本组室温条件下比较,健康对照组、虚热证组复合体 II 活性低温下调节速率均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),虚寒证组差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与健康对照组比较,虚寒证、虚热证低温、室温下调节速率均降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),与虚寒证组比较,虚热证组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 环境温度可影响线粒体复合体 II 活性,且对不同证型人群的影响程度不同,但其变化趋势基本一致。

**关键词** 虚寒证;虚热证;复合体 II;能量代谢

Effect of Various Ambient Temperatures on Activities of Mitochondrial Complex II in Patients of Deficiency-cold Syndrome and Deficiency-heat Syndrome YAN Pan-pan, YANG Li-ping, HUANG Rui, HU Yan-ping, HOU Jun-lin, LI Xin-min, and ZHAN Xiang-hong *Basic Discipline of Integrated Chinese and Western Medicine, Henan College of TCM, Zhengzhou (450046), China*

**ABSTRACT Objective** To explore activity laws of mitochondrial complex II in patients of deficiency-cold syndrome (DCS) and deficiency-heat syndrome (DHS) under various ambient temperatures. **Methods** Subjects were recruited by questionnaire and expert diagnosis from grade 1-3 undergraduates at Henan College of Traditional Chinese Medicine in November 2012, and assigned to a normal control group, the DCS group, and the DHS group, 20 in each group. Their venous blood samples were collected at two different temperature conditions. Activities of mitochondrial complex II were measured by spectrophotometry. **Results** (1) Comparison of mitochondrial complex II under various ambient temperatures: Compared with room temperature in the same group, activity values were all increased in the normal control group at cold temperature with significant difference ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference in the DCS group and the DHS group ( $P > 0.05$ ). Compared with the normal control group, activity values of complex II were reduced in the DCS group at cold and room temperatures with significant difference ( $P < 0.05$ ). Compared with the DCS group, activity values of complex II were increased in the DHS group with significant difference ( $P < 0.05$ ). (2) Changes of adjustment rates: Compared with room temperature, the adjustment rate all rose at cold temperature in the normal control group and the DHS group with significant difference ( $P < 0.05$ ), but with no significant difference found in the

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81072734);河南省杰出青年基金项目(No.114100510011)

作者单位:河南中医学院中西医结合基础学科(郑州 450046)

通讯作者:杨丽萍, Tel:0371-65934070, E-mail:bioyjp@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.04.0434

DCS group ( $P > 0.05$ ). Compared with the normal control group at the same temperature, the adjustment rate in the DHS group and the DCS group was all reduced at cold and room temperatures with significant difference ( $P < 0.05$ ). There were no significant difference in the adjustment rate between the DHS group and the DCS group ( $P > 0.05$ ). Conclusions Environment temperature can affect the activity of mitochondrial complex II with different influence degrees on different syndrome types of people, but its change trend are basically identical.

**KEYWORDS** deficiency-cold syndrome; deficiency-heat syndrome; complex II; energy metabolism

虚寒证和虚热证是中医临床常见证型,虚寒证在临床主要表现为畏寒肢冷,神疲乏力,面色皤白等,虚热证则主要表现为五心烦热,形体消瘦,口燥咽干等。有文献报道,虚寒证、虚热证机体都存在能量代谢异常<sup>[1,2]</sup>。线粒体呼吸链是机体能量代谢的场所<sup>[3]</sup>,其中,线粒体复合体 II 是三羧酸循环与线粒体电子传递链的载体,其活性异常直接影响电子传递与氧化呼吸作用<sup>[4,5]</sup>,进而影响能量代谢。那么,虚寒证和虚热证的产生是否与复合体 II 活性变化相关?此外,中医学注重环境与机体的相互作用<sup>[6]</sup>,目前国内对虚寒证和虚热证实质的研究报道虽多,但很少关注外界环境变化对虚寒证和虚热证的影响。本研究通过检测低温及室温状态下虚寒证和虚热证线粒体复合体 II 的活性变化,从而探讨不同环境温度下虚寒证、虚热证人群线粒体复合体 II 活性变化规律,现将报道如下。

## 资料与方法

**1 诊断标准** 阳虚、阴虚体质人群的筛选标准参考中医体质质量表(Constitution in Chinese Medicine Questionnaire, CCMQ)<sup>[7,8]</sup>;虚寒证、虚热证诊断标准参照《中医诊断学》<sup>[9]</sup>及《中医证候鉴别诊断学》<sup>[10]</sup>。

**2 纳入标准** (1)符合虚寒证、虚热证诊断标准者;(2)年龄 18~25 岁;(3)签署知情同意书。

**3 排除标准** (1)有线粒体相关疾病的患者;(2)感冒患者;(3)代谢性疾病患者。

**4 一般资料** 被试者来源于 2012 年 11 月在校的河南中医学院 1~3 年级本科生。参照文献<sup>[7,8]</sup>,筛选符合阳虚、阴虚及平和体质的人群,然后参照文献<sup>[9,10]</sup>中的虚寒证、虚热证诊断标准为参考,由 3 名具有中医执业医师资格的中级以上职称专家医师对以上 3 种人群依次进行诊断,分别筛选出虚寒证组(20 例)、虚热证组(20 例)及平和质人群 20 名为健康对照组,各组年龄均在 18~24 岁,性别比为 1:1。其中健康对照组平均(21.6±2.0)岁,虚寒证组平均

(20.6±2.1)岁、虚热证组平均(20.9±2.1)岁,虚寒证组和虚热证组症状持续时间均为 1 年。3 组基线资料比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。本研究经河南中医学院第一附属医院伦理委员会批准。

**5 样品采集** 被试人员进入实验室,分别处于寒冷(约 -4℃~5℃)环境 30 min、室温(25℃)环境中 20 min 后,抽取肘静脉血液 10 mL,并迅速倒入含 EDTA 的离心管中。

**6 观察指标及检测方法** 复合体 II 活性的测定 差速离心法分离血液样本中的白细胞(GMS10099.2,上海杰美基因科技有限公司提供),反复冻融法提取线粒体蛋白(-70℃~30℃反复冻融 3 次),净化线粒体蛋白,用卡玛斯亮蓝进行蛋白定量,将线粒体蛋白浓度调整为 10 μg/100 μL;在 30℃条件下使用分光光度计测定线粒体呼吸链复合体 II 活性。分光光度计测定条件:温度为 30℃,波长为 600 nm,做好样品布局;具体试剂配制及操作过程参见由上海杰美基因科技有限公司提供的试剂盒说明书(GMS50008v.A)。将 0 min 和 3 min 所测定数值分别记为 A1 和 A2,ΔA=A1-A2。复合体 II 调节速率从 0~3 min 各个时间点复合体 II 活性值拟合线性斜率的绝对值。

计算公式:复合体 II 活性=[(ΔA 样品-ΔA 背景)×1×样品稀释倍数]/[0.1(样品容量)×21.8(毫摩尔吸光系数)×3(min)]。

**7 统计学方法** 运用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间两两比较采用 t 检验,3 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

**1 各组不同温度下复合体 II 活性比较(表 1)** 与本组室温条件下比较,健康对照组低温条件下的复合体 II 活性升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),虚寒证组、虚热证组则差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );

与健康对照组比较,虚寒证组低温、室温条件下复合体 II 活性均降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),虚热证组在室温、低温下复合体 II 活性均升高,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与虚寒证组比较,虚热证组低温、室温下复合体 II 活性差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 各组不同温度下复合体 II 活性的比较  
[ $\mu\text{mol} / (\text{min} \cdot \text{mg})$ ,  $\bar{x} \pm s$ ]

组别	例数	复合体 II 活性	
		室温	低温
健康对照	20	0.006 8 ± 0.001 7	0.018 0 ± 0.002 0*
虚寒证	20	0.002 8 ± 0.000 9 <sup>△</sup>	0.003 0 ± 0.001 3 <sup>△</sup>
虚热证	20	0.015 6 ± 0.004 0 <sup>▲</sup>	0.020 8 ± 0.003 5 <sup>▲</sup>

注:与本组室温比较,\* $P < 0.05$ ;与健康对照组同条件比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与虚寒证组同条件比较,<sup>▲</sup> $P < 0.05$

2 各组低温、室温条件下复合体 II 活性调节速率比较(表 2) 与本组室温条件下比较,健康对照组、虚热证组复合体 II 活性低温下调节速率均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),虚寒证组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与健康对照组比较,虚寒证、虚热证组低温、室温下调节速率均降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );与虚寒证组比较,虚热证组低温、室温下差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 2 各组不同温度下复合体 II 活性调节速率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	复合体 II 活性调节速率	
		室温	低温
健康对照	20	0.009 4 ± 0.006 0	0.035 6 ± 0.006 1*
虚寒证	20	0.000 5 ± 0.000 1 <sup>△</sup>	0.000 9 ± 0.000 2 <sup>△</sup>
虚热证	20	0.000 6 ± 0.000 2 <sup>△</sup>	0.001 2 ± 0.000 5* <sup>△</sup>

注:与本组室温比较,\* $P < 0.05$ ;与健康对照组同条件比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

线粒体复合体 II, 又称琥珀酸一泛醌还原酶, 它能将琥珀酸脱下的氢及电子经黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、铁硫蛋白传递给泛醌<sup>[11]</sup>, 是控制琥珀酸氧化呼吸链反应的第一步, 是氧化磷酸化产能过程的关键酶<sup>[12,13]</sup>, 因此, 其活性异常将影响机体的产能。本试验结果显示, 不论在室温还是低温条件下, 3 组人群在相同环境温度下复合体 II 活性均表现为虚寒证组 < 健康对照组 < 虚热证组, 且虚寒证组与健康对照组比较, 差异有统计学意义。即虚热证人群体内复合体 II 活性偏高, 虚寒证人群复合体 II 活性偏低, 影响其线粒体氧化磷酸化产能功能。因此, 在相同环境中, 虚热证人群表现为能量代谢亢进, 虚寒证人群能量代谢低下。陈

群等<sup>[14]</sup>的研究发现, 虚热证大鼠体内琥珀酸脱氢酶活性升高, 可能与肝细胞氧化磷酸化亢进有关, 周志东等<sup>[15]</sup>的研究也表明“热体”大鼠的能量生成高于“寒体”, 与本试验研究结果一致。而在两种条件下, 健康对照组与虚热证组差异均无统计学意义, 可能是因为虚热证人群常态下的复合体 II 活性升高, 冷刺激对其活性影响不大, 且本试验设置的低温环境也不是人体最低耐受温度, 不足以引起其体内复合体 II 活性剧烈变化所致。

此外, 中医学理论对环境与机体之间的关系早有研究, 《灵枢·口问》<sup>[16]</sup>就阐释, “寒气客于皮肤, 阴气盛, 阳气虚, 故为振寒寒栗”, 《素问·疟论》<sup>[16]</sup>也讲, “衰则气复反入, 入则阳虚, 阳虚则寒矣”等。外界环境对正常人群及虚寒证、虚热证人群均能产生影响。现代医学研究表明, 环境温度能通过影响线粒体复合体的活性从而影响能量的生成, 进而使机体产生各种反应<sup>[17,18]</sup>。本试验结果显示, 当温度变化时, 与室温比较, 低温下复合体 II 活性均升高, 提示低温环境时复合体 II 处于兴奋状态, 原因可能为 3 组人群机体为满足在低温状态时对能量的需要所做的调节反应; 另外, 只有健康对照组人群在不同温度条件下复合体 II 的活性差异有统计学意义, 说明当外界温度变化时, 健康人群体内复合体 II 活性能迅速产生变化以适应机体的需要, 而虚寒证、虚热证人群复合体 II 活性的调节能力较健康人群降低。这也充分说明虚寒证、虚热证人群为何会对外界温度的变化耐受性较差。本研究结果与梁月华等<sup>[19]</sup>等对虚寒证、虚热证大鼠在受到温度等应激条件时的研究结果具有很好的一致性。至于当外界环境温度变化时, 虚寒证、虚热证人群复合体 II 活性差异均无统计学意义, 原因可能为, 在本试验中由于温度极差设计的不足, 再加上两组人群能量代谢调节功能下降, 不能对两组人群体内复合体 II 活性迅速进行调节所致。

本试验初步证实, 在相同环境温度下, 3 组人群复合体 II 活性不同, 虚热证最高, 健康人群次之, 虚寒证人群最低; 当环境温度变化时, 3 组人群复合体 II 活性也不同, 低温环境下复合体 II 活性均高于室温, 且随着环境温度变化, 虚寒证、虚热证人群体内线粒体复合体 II 活性的调节速率低于健康人。这些可能是虚寒证、虚热证发生的物质基础之一, 并且经大样本人群检验后, 可望作为临床诊断及治疗虚寒证、虚热证的一个参考指标。然而, 由于伦理学的限制, 本课题并没有对高温环境进行特殊设置, 在以后的研究中会进一步尝试对高温环境下复合体 II 活性进行探讨, 以期能进一步丰富虚寒证、虚热证本质现

代化研究的理论体系。

### 参 考 文 献

- [1] 薛春苗, 张冰, 金锐, 等. 虚寒状态动物模型的评价研究[J]. 中华中医药杂志, 2012, 34(8): 1065-1066.
- [2] Tan C, Wang J, Feng W, et al. Preliminary correlation between warm needling treatment for knee osteoarthritis of deficiency-cold syndrome and metabolic functional genes and pathways[J]. J Acupunct Meridian Studies, 2010, 3(3): 173-180.
- [3] 于研, 王硕仁, 孙逸坤, 等. 川芎嗪在逆转心肌细胞肥大过程中对心肌细胞线粒体结构和功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(5): 661-665.
- [4] 洪岩, 朴丰源, 李盛, 等. 亚慢性染砷对小鼠脑组织线粒体琥珀酸脱氢酶活性及蛋白表达的影响[J]. 中国工业医学杂志, 2009, 22(4): 247-259.
- [5] Siebels I, Dröse S. Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates[J]. Biochimica Biophysica Acta, 2013, 827(10): 1156-1164.
- [6] 金锐, 张冰. 基于机体对寒冷刺激的适应性改变原理探讨阳虚证畏寒肢冷的实质[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(5): 696-699.
- [7] 王琦, 朱燕波, 薛禾生. 中医体质量表的初步编制[J]. 中国临床康复, 2006, 10(3): 12-14.
- [8] 王琦, 朱燕波. 中国一般人群中中医体质流行病学调查 - 基于全国 9 省市 21948 例流行病学调查数据[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(1): 7-12.
- [9] 朱文峰, 庄泽澄, 吴承玉, 等. 中医诊断学[M]. 第 3 版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 141-145.
- [10] 姚乃礼, 朱建贵, 高荣材, 等. 中医证候鉴别诊断学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 68-70.
- [11] 邹悦. Cr(VI) 对 L-02 肝细胞线粒体呼吸链复合体的影响[D]. 长沙: 中南大学, 2012: 1-2.
- [12] Tomitsuka E, Kita K, Esumi H. Regulation of succinate-ubiquinone reductase and fumarate reductase activities in human complex II by phosphorylation of its flavoprotein subunit[J]. Proc Japan Acad Ser B Phys Biolog Sci, 2009, 85(7): 258-265.
- [13] Maklashina E, Cecchini G, Dikanov SA. Defining a direction: electron transfer and catalysis in *Escherichia coli* complex II enzymes[J]. Biochimica Biophysica Acta, 2013, 1827(5): 668-678.
- [14] 陈群, 刘亚梅, 徐志伟, 等. 实热证、虚热证模型大鼠肝细胞琥珀酸脱氢酶活性研究[J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(5): 48-49.
- [15] 周志东, 王学敏, 缪明勇, 等. “寒体”、“热体”大鼠肝线粒体能量代谢的研究[J]. 上海中医药大学学报, 2000, 14(2): 34-37.
- [16] 孙广仁. 《内经》中阳虚的概念及相关的几个问题[J]. 山东中医药大学学报, 2005, 29(4): 300-301.
- [17] 钱令嘉, 程素琦, 吴孟平, 等. 热应激大鼠心肌线粒体功能变化[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(4): 333-335.
- [18] 王琴, 黄慧玲, 刘锐, 等. 亚低温对急性颅脑创伤大鼠线粒体呼吸链酶活性的影响[J]. 天津医药, 2008, 36(8): 524-526.
- [19] 梁月华, 王晶. 寒热本质动态研究[J]. 中西医结合杂志, 1988, 8(6): 349-351.

(收稿:2013-10-16 修回:2014-12-29)

## Chinese Journal of Integrative Medicine 《中国结合医学杂志》英文版

### SCI 影响因子提升至 1.401

2014 年 7 月 30 日, 汤森路透 (Thomson Reuters) 发布 2013 年 SCI 影响因子。Chinese Journal of Integrative Medicine 最新 SCI 影响因子为 1.401, 较 2012 年的 1.059 提高 32.3%, 在 22 本结合医学领域期刊中排名第 11 名, 正式进入 Q2 区。以当年 SCI 期刊的影响因子为主要依据, 将所有期刊按照专业分为 Q1、Q2、Q3、Q4 区, 分别对应排名为 0~25%、26%~50%、51%~75%、76%~100% 的期刊, 一区一般是各领域的顶尖期刊, 二区是高水平期刊, 三区次之, 四区则更普通。我刊进入 Q2 区标志着我刊的国际影响力提升一个新台阶。